

(Translation)

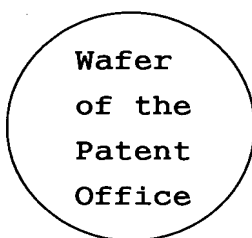
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application : September 22, 1999

Application Number : Patent Appln. No. 1999-269398

Applicant(s) : CanBas Co., Ltd.



April 8, 2004

Yasuo IMAI

Commissioner,
Patent Office

Seal of
Commissioner
of
the Patent
Office

Appln. Cert. No.

Appln. Cert. Pat. 2004-3028728

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 1 9 9 9 年 9 月 2 2 日
Date of Application:

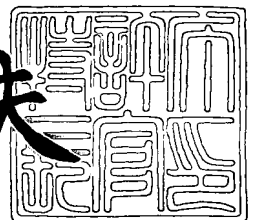
出 願 番 号 平成 1 1 年特許願第 2 6 9 3 9 8 号
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 1 9 9 9 - 2 6 9 3 9 8]

出 願 人 株式会社キャンバス
Applicant(s):

2 0 0 4 年 4 月 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 2 8 7 2 8

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP99226-YS

【提出日】 平成11年 9月22日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 14/00

【発明の名称】 オリゴペプチド

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市瑞穂区密柑山町 1 - 4 4 - 1
コーポ岡田 3 0 5 号

【氏名】 河邊 拓己

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県豊田市渋谷町 1 - 1 - 1 6

【氏名】 菅沼 正司

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市瑞穂区松栄町 2 - 7 6 - 2
メゾンファミリー 2 A

【氏名】 岡本 尚

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県豊明市二村台 7 - 3 5 - 5

【氏名】 船曳 孝彦

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 オリゴペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するオリゴペプチド。

【請求項 2】 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するオリゴペプチド。

【請求項 3】 配列番号 3 のアミノ酸配列からなる請求項 1 のオリゴペプチド。

【請求項 4】 配列番号 4 のアミノ酸配列からなる請求項 2 のオリゴペプチド。

【請求項 5】 配列番号 1 のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドを保有する発現ベクター。

【請求項 6】 配列番号 2 のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドを保有する発現ベクター。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、新規なオリゴペプチドに関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、癌細胞における DNA 障害に対するチェックポイント機構を特異的に破壊することにより、例えば癌細胞の抗癌剤に対する感受性を顕著に増強させることのできるオリゴペプチドと、このオリゴペプチドの利用に関するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

抗癌剤の多く（例えば、ブレオマイシン等）は、癌細胞に対する DNA 損傷を作用機序としている。

【0 0 0 3】

正常細胞では、DNA 障害が起こった場合には、細胞周期 G 1 期チェックポイントおよび G 2 期チェックポイントにおいて細胞周期を停止し、障害を受けた DNA を修復するが、正常細胞における修復機能は G 1 期チェックポイントによる

停止期に働くことが主であり、G 2 期チェックポイントの役割は少ないと考えられている。

【0 0 0 4】

一方、分子腫瘍学における最近の進歩によって、G1細胞周期チェックポイントが大半のヒト癌細胞で損なわれていることが明らかにされている。癌細胞の大部分は、G 1 期チェックポイントに関係する p 53、Rb、p 16^{INK4}や p 19^{ARF}のような癌抑制遺伝子に突然変異を有するか、またはMDM-2 やサイクリンDのような癌遺伝子が過剰発現している（参考文献 1、2）。これらに加えて、増殖因子の過剰発現やこれら遺伝子、それらのレセプターまたは下流シグナル伝達分子の機能獲得突然変異によって引き起こされる過剰な増殖シグナルが、G1期チェックポイントを機能不全にすることによって細胞の形質転換を生じさせていると考えられる。例外的に、癌細胞のなかにはG1期チェックポイントではなくてG2期チェックポイントが破壊されているものもある（参考文献 3）。このことは、正常な細胞周期においては、G2期チェックポイントと比較してG1期チェックポイントが相対的に重要であることを示している。突然変異の過剰集積はおそらく細胞に致命的であるが、上記のチェックポイントの破壊による突然変異率の上昇により最終的に発癌に至る突然変異を細胞に集積させる（参考文献 4、5）。

【0 0 0 5】

興味深いことに、G1期チェックポイントが損なわれている癌細胞においてもG2期チェックポイントは保持されている。正常細胞はG1とG2の2つの独立したDNA損傷チェックポイントを有しているので、何らかの処理によってG2期チェックポイントが選択的に破壊された場合、G1期チェックポイントが既に破壊されている癌細胞は、無傷のG1期チェックポイントを有する正常細胞よりもDNA損傷処理に対して一層敏感になるものと期待される。例えば、カフェイン等による非特異的なG2期チェックポイント破壊はp 53欠失癌細胞をDNA損傷に対して感受性にするのに有効であることが報告されている（参考文献 6 - 7）。

【0 0 0 6】

G2期チェックポイントに関する現在の仮説によれば、DNA損傷はrad3⁺/A

T Mの活性化によってプロテインキナーゼChk1およびHuCds1/Chk2を活性化
する（参考文献11-14）。次いで、Chk1およびHuCds1/Chk2はヒトではCdc2
5Cの216番セリンをリン酸化し、そして14-3-3との結合を促進する（参考文献15
-17）。分裂酵母では、14-3-3とCdc25Cとの結合によってCdc25Cは細胞質中
に隔離され（参考文献18）、その結果Cdc25CによるCdc2/サイクリンBの活性
化が阻害されるので、最終的にG2停止が誘導され、DNAの修復が行われる（
参考文献19-21）。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

前記のとおり、G1期チェックポイントが損なわれている癌細胞においては、
さらにG2期チェックポイントが選択的に破壊されれば、抗癌剤等のDNA障害
処理に対して感受性となり、効果的な癌治療が可能となるものと期待される。ま
た、そのような治療においては、G1およびG2の2つのチェックポイント機構
を持たない癌細胞を対象とすることになるため、比較的少ない量の抗癌剤によっ
ても癌細胞を死滅させることが可能であり、正常細胞への副作用を大幅に低減す
ることが可能となる。

【0008】

この出願は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、細胞周期の
G2チェックポイントを選択的に破壊することのできる新規なオリゴペプチドを
提供することを課題としている。

【0009】

また、この出願は、このオリゴペプチドの発現ベクターを提供することを課題
としている。

【0010】

【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するものとして、以下の(1)～(6)の発明を提供
する。

- (1) 配列番号1のアミノ酸配列を有するオリゴペプチド。
- (2) 配列番号2のアミノ酸配列を有するオリゴペプチド。

- (3) 配列番号 3 のアミノ酸配列からなる前記(1)のオリゴペプチド。
- (4) 配列番号 4 のアミノ酸配列からなる前記(2)のオリゴペプチド。
- (5) 配列番号 1 のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドを保有する発現ベクター。
- (6) 配列番号 2 のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドを保有する発現ベクター。

【 0 0 1 1 】

以下、これらの発明の実施の形態について詳しく説明する。

【 0 0 1 2 】**【発明の実施の形態】**

この出願の発明(1)は、公知のヒト Cdc25C (GenPept. Accession No. NP 001 781) の211～221番アミノ酸配列に相当するペプチド(配列番号 1)を含むオリゴペプチドである。また、発明(2)は、ヒト Cdc25C の211～221番アミノ酸配列のうち、216番セリン残基 (Ser) をアラニン残基 (Ala) に置換したアミノ酸配列(配列番号 2)を有するオリゴペプチドである。すなわち、この出願の発明者らは、配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列を有するペプチドが、プロテインキナーゼ Chk1 および HuCds1/Chk2 の活性を抑制することにより、G 2 期チェックポイントを選択的に破壊することを見出して、この発明を完成させた。

【 0 0 1 3 】

この発明(1)および(2)のオリゴペプチドには、各々、配列番号 1 および 2 のペプチドに、例えば細胞膜通過機能を有するペプチド等を結合させることが好ましい。このような細胞膜通過ペプチドとしては、公知の HIV-1・TAT の部分配列や、ショウジョウバエのホメオボックスタンパク質アンテナペディアの部分配列(例えば、配列番号 6)を使用することができる。

【 0 0 1 4 】

また、発明(3)および(4)は、各々、配列番号 3 および配列番号 4 のアミノ酸配列からなるオリゴペプチドである。これらのオリゴペプチドにおいて、C 末端側の 11 アミノ酸配列は、それぞれ配列番号 1 および配列番号 2 の配列であり、N 末端側の 11 アミノ酸配列は、公知の HIV-1・TAT (GenPept. Accession NO. C

AA45921：参考文献22、23) の47～57番アミノ酸配列に相当する。このH I V-1・T A T部分配列は、その細胞膜通過機能により、C末端側のペプチドを細胞内に形質導入するために付加されている。

【0 0 1 5】

これらの各オリゴペプチドは、配列番号1～4の情報に基づき、公知の固相ペプチド合成法等により調製することができる。

発明(1)ないし(4)のオリゴヌクレオチドは、これらを癌組織に投与し、癌細胞のG 2期チェックポイントを破壊すると同時に、抗癌剤を投与することによって癌細胞を死滅させる癌治療方法に用いることができる。特に、発明(3)および(4)のオリゴペプチドは、そのN末端側のH I V-1・T A T部分配列によって癌細胞内に容易に取り込まれ、C末端側のペプチドがG 2期停止に関与するプロテインキナーゼChk1およびHuCds1/Chk2の活性を抑制する。既にG 1期チェックポイント機能を喪失している癌細胞は、G 2期に停止してDNA修復を行うことができないため、抗癌剤をより有効に作用させることができる。この治療方法において、オリゴペプチドは、例えば適当な溶媒等に適量を溶液化し、癌組織に直接投与することができる。あるいは、癌細胞を認識する抗体等と結合することによって、全身投与することもできる。抗癌剤としては、DNA障害を作用機序とする公知の薬剤（例えば、ブレオマイシン等）を用いることができる。

【0 0 1 6】

この出願の発明(5)および(6)は、各々、配列番号1および2のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド(33bp)を保有する発現ベクターである。配列番号1のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、ヒトCdc25CのcDNA配列(GenBank Accession No. NM 001790)に基づいて調製したオリゴヌクレオチドプローブによりヒトCDNAライブラリーをスクリーニングすることによって、あるいは、オリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCR法によってCdc25C・cDNAを取得し、このcDNAを適当なヌクレアーゼ等で処理することにより作製することができる。あるいは、ヒトCdc25CのcDNAを保有する公知のクローンpA S2Cdc25Cからインサート部分を切り出し、ヌクレアーゼ処置等によって該当するDNA断片を作製することもできる。また、配列番号1のアミノ

酸配列をコードするポリヌクレオチドは、Cdc25CのcDNAを鋳型とする公知の変異導入PCR法等により、所定のSerコドンがAlaコドンに置換したポリヌクレオチドを作製することができる。なお、ベクターとしては、動物細胞にトランスフェクションすることのできるウイルスベクター（例えばアデノウイルスベクター等）を使用する。

【0017】

これらの発現ベクターは、例えばベクターを癌細胞にトランスフェクションし、細胞内において配列番号1または2のアミノ酸配列を有するペプチドを発現させ、これによって癌細胞のG2期チェックポイントを破壊した後、抗癌剤を投与することによって癌細胞を死滅させる癌治療方法に用いることができる。

【0018】

以下、実施例を示してこの出願の前記発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0019】

【実施例】

配列番号3のアミノ酸配列からなるオリゴペプチド（TAT-S216）および配列番号4のアミノ酸配列からなるオリゴペプチド（TAT-S216A）を公知の固相ペプチド合成法により作製した。

【0020】

また、コントロールとして配列番号5にアミノ酸配列を示したオリゴペプチド（TAT-Control）を作製した。このコントロールは、N末端側の11アミノ酸配列がHIV-1・TAT部分配列であり、C末端側の11アミノ酸配列は配列番号1に示したCdc25C部分配列のアミノ酸残基をランダムに配置している。

【0021】

これらのオリゴペプチドを用い、細胞の細胞周期状態および細胞の抗癌剤感受性に対するオリゴペプチドの作用を試験した。なお、試験2～5に共通する材料と方法は以下のとおりとした。

(a) 細胞

Jurkat、MIA PaCa2およびPANC1はRPMI 1640（Sigma）、イーグル

最少必須培地 (Iwaki) 並びにダルベッコ修正イーグル培地 + 4 mM l-グルコース (Sigma) および 1.0 mM ピルビン酸ナトリウム (Gibco BRL) 中でそれぞれに 10% のウシ胎児血清を加えて 37°C / 5 % CO₂ で培養した。正常な末梢血リンパ球 (PBL) はフィコール・パク (Pharmacia) 傾斜法を使用して調製した。PBL は 5 µg/ml PHA (Nacalai tesque) で 5 日間刺激し、1 回洗浄し、そして 5 µg/ml PHA およびブレオマイシン + ペプチドで更に刺激した。

(b) ヒストン H1 キナーゼアッセイ

1 × 10⁷ 個の細胞を冷 PBS 中で洗浄し、そして 1 ml の緩衝液 A 中 4 °C で溶解した。p13suc1 アガロースビーズ (20 µg/ml: Upstate biotechnology) を上記清明溶解物に加え、4 °C で 4 時間インキュベートし、そしてビーズを緩衝液 B で 5 回洗浄した。p13suc1 アガロースは Cdc2 キナーゼアッセイキット (Upstate biotechnology) および [γ-³²P] ATP を使用してヒストン H1 キナーゼ活性について分析し、続いて 12% SDS-PAGE 電気泳動にかけ、そしてオートラジオグラフィーにかけて、リン酸化したヒストン H1 を検出した。

試験 1

TAT-S216 および TAT-S216A の Chk1 および Chk2 活性阻害作用を *in vitro* 系で試験した。

【0022】

ヘマグルチニン (HA) エピトープをつけ、バキュロウイルスを用いて昆虫の細胞で発現させたヒト Chk1 および c-myc エピトープをつけた Chk2 を、それぞれ HA および c-myc に対する抗体を用いて免疫沈降し、大腸菌を用いて作成した GST-Cdc25C (アミノ酸位置 200-256) または合成ペプチド (Cdc25C のアミノ酸位置 201-211) を基質としたリン酸化反応を行い、この反応に TAT-S216 および TAT-S216A をそれぞれ加えることにより、その阻害作用を確認した。反応は 30°C 15 分で行い、阻害作用は 15% SDS-PAGE およびオートラで測定した。

【0023】

結果は図 1 および図 2 に示したとおりであり、Chk1 および Chk2 のリン酸化反応は TAT-S216 および TAT-S216A により顕著に抑制された。この結果か

ら、この発明のオリゴペプチドはプロテインキナーゼ Chk1 および HuCds1/Chk2 の活性を抑制することが確認された。

試験 2

T A T - S 216 および T A T - Control で処理した細胞の細胞周期状態を、DNA 損傷誘導 G2 停止中にフローサイトメトリーおよびヒストン H1 キナーゼアッセイで分析した。

【 0 0 2 4 】

T A T - Control ペプチドとブレオマイシン (Bleo) とで処理した Jurkat 細胞は G2 で停止した (図 3 左下)。対照的に、T A T - S 216 ペプチドで処理した細胞は G 2 停止を示さなかった (図 3 左上)。なお、T A T - S 216 ペプチド単独では正常な細胞周期に対して明白な効果を示さなかった (データは示さず)。これらの結果と一致して、Cdc2 のヒストン H1 キナーゼ活性はブレオマイシンと T A T - Control による処理で消失したが (データは示さず)、T A T - S 216 ペプチドの添加では正常に比べて増加した (図 4)。他方、コルヒチン (紡錘体形成の阻害試薬) で処理して活性化した M 期チェックポイントは T A T - S 216 ペプチドでは影響されなかった (図 5)。

【 0 0 2 5 】

以上の結果から、T A T - S 216 ペプチドは、DNA 損傷による G2 期チェックポイントを特異的に破壊することが確認された。

試験 3

T A T - S 216 ペプチドによる DNA 損傷誘導 G2 停止の終了が癌細胞を抗癌剤に対して高感受性にするかどうかを試験するために、癌細胞 Jurkat を用いて試験した。また正常細胞への影響を調べるため、フィトヘマグルチニン (P H A) で刺激した正常ヒト T 細胞 (P H A 芽細胞) をブレオマイシンとペプチドで処理した。

【 0 0 2 6 】

その結果、図 6 に示したように、T A T - S 216 ペプチド単独ではこれらの細胞に対して明白な効果を示さなかったが、このペプチドの添加によって Jurkat はブレオマイシンに対して感受性となった。コントロールの T A T - Control ペ

プチドは J urkat に対するブレオマイシンの細胞傷害活性に影響を与えなかった（データは示さず）。また、図 5 の細胞周期パターンからも予想されるように、T A T - S 216 ペプチドはコルヒチンによる細胞傷害には影響を与えなかった（図 7）。

【 0 0 2 7 】

以上の結果から、この発明のオリゴペプチドとブレオマイシンによって引き起こされる細胞死は G 2 停止欠損の結果であって、非特異的な細胞死経路に与える効果によるものではないことが示された。

【 0 0 2 8 】

さらに、P H A 刺激活性化 T 細胞は J urkat と同じ速さで分裂するが、ブレオマイシン処理に応答した P H A 刺激活性化 T 細胞の感受性（図 8）および細胞周期パターン（図 9）は T A T - S 216 ペプチドでは影響されなかった。これらの結果は、細胞のブレオマイシン感受性に対する T A T - S 216 ペプチドの効果は、生存に対する G 2 期チェックポイント活性への細胞の依存度に相関していることが示唆された。

【 0 0 2 9 】

さらに、M I A P a C a 2 細胞と P A N C 1 細胞を使用して同様な実験を行った。これらの細胞はブレオマイシン処理によって G 2 期に停止された（データは示さず）。図 10 および図 11 に示したように、これらの細胞も T A T - S 216 ペプチドによってブレオマイシンに感受性になったが、コントロールのペプチドでは感受性にならなかった。

試験 4

T A T - S 216、T A T - S 216 A および T A T - Control で処理した J urkat 細胞の細胞周期状態を、ブレオマイシン処理の 24 時間後にフローサイトメトリーで分析した。

【 0 0 3 0 】

結果は図 3 に示したとおりである。T A T - Control ペプチドとブレオマイシンとで処理した J urkat 細胞（図 3 左下）は G 2 期で停止したままであるのに対し、T A T - S 216（図 3 左下）および T A T - S 216 A（図 3 右上）を処理した場

合には、ブレオマイシン処理による G 2 期停止がこれらのペプチド処理により欠損した。

【0 0 3 1】

一方、図 5 に示した T A T - S 216 ペプチドの結果と同様に、コルヒチンで処理して活性化した M 期チェックポイントは T A T - S 216 A ペプチドでも影響されなかった（図 5）。

【0 0 3 2】

以上の結果から、T A T - S 216 A ペプチドも、T A T - S 216 ペプチドと同様に、DNA 損傷による G 2 期チェックポイントを特異的に破壊することが確認された。

試験 5

試験 3 と同様にして、T A T - S 216 A ペプチドによる DNA 損傷誘導 G 2 停止の欠損が癌細胞を抗癌剤に対して高感受性にするかどうかを試験した。

【0 0 3 3】

結果は図 6 に示したとおりである。T A T - S 216 A ペプチドは T A T - S 216 ペプチドと同様に、J urkat 細胞をブレオマイシンに対して高感受性とした。

【0 0 3 4】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、DNA 傷害処理による癌細胞の G 2 期停止を特異的に阻害することのできるオリゴペプチドが提供される。このオリゴペプチド処理によって癌細胞は抗癌剤等に対して感受性となるため、抗癌剤を用いた癌治療をより効果的に行うことが可能となる。

【0 0 3 5】

【配列表】

<110> 科学技術振興事業団 (Japan Science and Technology Corporation)

<120> オリゴペプチド

<130> NP99226-YS

<160> 6

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapience

<223> A part of Cdc25C

<400> 1

Leu Tyr Arg Ser Pro Ser Met Pro Glu Asn Leu

1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 2

Leu Tyr Arg Ser Pro Ala Met Pro Glu Asn Leu

1 5 10

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 3

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Tyr Arg Ser Pro

1 5 10 15

Ser Met Pro Glu Asn Leu

20

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 4

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Tyr Arg Ser Pro

1 5 10 15

Ala Met Pro Glu Asn Leu

20

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Artificial Sequence: Synthesized peptide

<400> 5

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Tyr Leu Ser Arg Ser

1 5 10 15

Asn Pro Met Pro Glu Leu

20

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Drosophila

<223> A part of Antennapedia gene product

<400> 6

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Phe Lys

1 5 10 15

【 0 0 3 6 】

【参考文献】

1. Levine, A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 88, 323-331 (1997).
2. Larsen, C.J. Contribution of the dual coding capacity of the pl

- 6INK4a/MTS1/CDKN2 locus to human malignancies. *Prog. Cell. Cycle. Res* 3, 109-124 (1997).
3. Kawabe, T., Muslin, A.J. & Korsmeyer, S.J. Hox11 interacts with protein phosphatases PP2A and PP1 and disrupts a G2/M cell-cycle checkpoint. *Nature* 385, 454-458 (1997).
 4. Hartwell, L.H. & Kastan, M.B. Cell cycle control and cancer. *Science* 266, 1821-1828 (1994).
 5. Paulovich, A.G., Toczyski, D.P. & Hartwell, L.H. When checkpoints fail. *Cell* 88, 315-321 (1997).
 6. Rowley, R. Reduction of radiation-induced G2 arrest by caffeine. *Rad. Res* 129, 224-227 (1992).
 7. Yao, S.L. et al. Selective radiosensitization of p53-deficient cells by caffeine-mediated activation of p34^{cdc2} kinase. *Nature Med* 2, 1140-1143 (1996).
 8. DeFrank, J.S., Tang, W. & Powell, S.N. p53-null cells are more sensitive to ultraviolet light only in the presence of caffeine. *Cancer Res* 56, 5365-5368 (1996).
 9. Wang, S.W., Norbury, C., Harris, A.L., Toda, T. Caffeine can override the S-M checkpoint in fission yeast. *J. Cell Sci.* 112, 927-937 (1999).
 10. Wang, Q., Fan, S., Eastman, A., Worland, R.J., Sausville, E.A. & O'Connor, R.M. UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53. *J. Natl. Cancer. Inst* 88, 956-965 (1996).
 11. Walworth, N., Davey, S., Beach, D. Fission yeast chk1 protein kinase links the Rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature* 363, 368-371 (1993).
 12. Walworth, N.C., Bernards, R. rad-dependent-response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science* 271, 35

- 3-356 (1996).
13. Matsuoka, S., Huang, M., Elledge, S.J. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282, 1893-1897 (1998).
 14. Zeng, Y. et al. Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature* 395, 507-510 (1998).
 15. Furnari, B., Rhind, N., Russell, P. Cdc25C mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* 277, 1495-1497 (1997).
 16. Sanchez, Y. et al. Conservation of the chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to cdk regulation through cdc25. *Science* 277, 1497-1501 (1997).
 17. Peng, C.Y. et al. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of cdc25C on serine-216. *Science* 277, 1501-1505 (1997).
 18. Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O., Russell, P. Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* 397, 172-175 (1999).
 19. Nurse, P. Checkpoint pathways come of age. *Cell* 91, 865-867 (1997).
 20. Weinert, T.A. DNA damage checkpoint meets the cell cycle engine. *Science* 277, 1450-1451 (1997).
 21. Russell, P. Checkpoints on the road to mitosis. *TIBS* 23, 399-402 (1998).
 22. Nagahara, H. et al. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nature Med* 4, 1449-1452 (1998).
 23. Vocero-Akbain, A.M., Heyden, N.V., Lissy, N.A., Ratner, L., Dow

dy, S.F. Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. Nature Med 5, 29-33 (1999).

【図面の簡単な説明】

【図 1】

T A T - S 216 および T A T - S 216 A の Chk1 活性阻害の in vitro 実験結果を示すプロッティング図である。Chk1 の基質なる G S T - Cdc25C (1 μ M) に T A T - S 216 および T A T - S 216 A (10 μ M) を加えて in vitro リン酸化反応を行った。

【図 2】

T A T - S 216 A の Chk1 および Chk2/HcCds1 活性阻害の実験結果を示すプロッティング図である。基質となる Cdc25C ペプチド (10 μ M) の 4 倍量の T A T - S 216 A (40 μ M) にて Chk1 および Chk2/HcCds1 の活性が阻害された。

【図 3】

ブレオマイシン (5 μ g/ml) で処理した後、T A T - S 216 および T A T - S 216 A を形質導入し、ヨウ化プロピジウム (P I) で染色した J urkat のフローサイトメトリー分析の結果である。縦軸は細胞数、横軸は P I 染色による DNA 含有量を示す。

【図 4】

J urkat 細胞におけるヒストン H1 キナーゼ分析の結果である。レーン 1 は無処理、レーン 2 は 2.5 μ g/ml コルヒチン処置 6 時間後、レーン 3 は 20 μ g/ml ブレオマイシン + 20 μ g/ml T A T - Control ペプチド処理の 6 時間後、レーン 4 は 20 μ g/ml ブレオマイシン + 20 μ g/ml T A T - S 216 ペプチド処置の 6 時間後に測定した。

【図 5】

2.5 μ g/ml コルヒチンで処理した後、T A T - Cdc25C ペプチドを形質導入し、ヨウ化プロピジウム (P I) で染色した J urkat のフローサイトメトリー分析の結果である。縦軸は細胞数、横軸は P I 染色による DNA 含有量を示す。

【図 6】

トリパンブルー色素排除法によるブレオマイシン処理 J urkat の細胞生存分析

の結果を示すグラフである。。縦軸は細胞の生存%、横軸は時間を示す。なお、T A T - S 216ペプチドは20 μ g/mlを処理した。

【図 7】

トリパンプルー色素排除法によるコルヒチン処理 J urkatの細胞生存分析の結果を示すグラフである。縦軸は細胞の生存%、横軸は時間を示す。なお、コルヒチンは2.5 μ g/ml、T A T - S 216ペプチドは20 μ g/mlを処理した。

【図 8】

トリパンプルー色素排除法によるブレオマイシン処理 P H A 活性化 T 細胞の細胞生存分析の結果を示すグラフである。縦軸は細胞の生存%、横軸は時間を示す。なお、ブレオマイシンは 5 μ g/ml、T A T - S 216ペプチドは20 μ g/mlを処理した。

【図 9】

ブレオマイシン (5 μ g/ml) で処理した後、T A T - C dc25 C ペプチドを形質導入し、ヨウ化プロピジウム (P I) で染色した P H A 活性化 T 細胞のフローサイトメトリー分析の結果である。縦軸は細胞数、横軸は P I 染色による D N A 含有量を示す。

【図10】

M I A P a C a 2細胞をブレオマイシン (90 μ g/ml) + T A T - S 216または T A T - Controlペプチドで処理した場合の細胞の生存を測定した結果を示すグラフである。なお、細胞生存は、ブレオマイシンとペプチドを添加した後、所定の時間に X T T アッセイ (Cell Proliferation Kit II : Roche) で測定した。

【図11】

P A N C 1細胞の生存結果を図10と同様に示したグラフである。

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

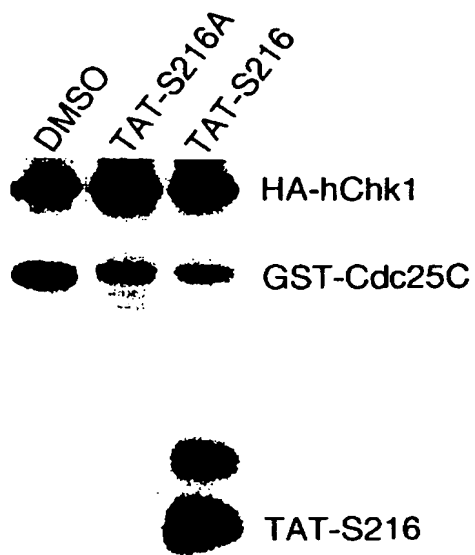
- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

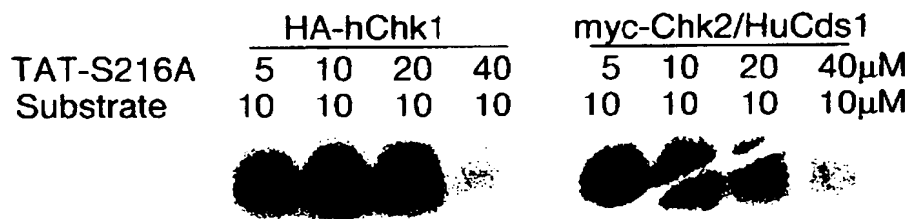
**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

【書類名】 図面

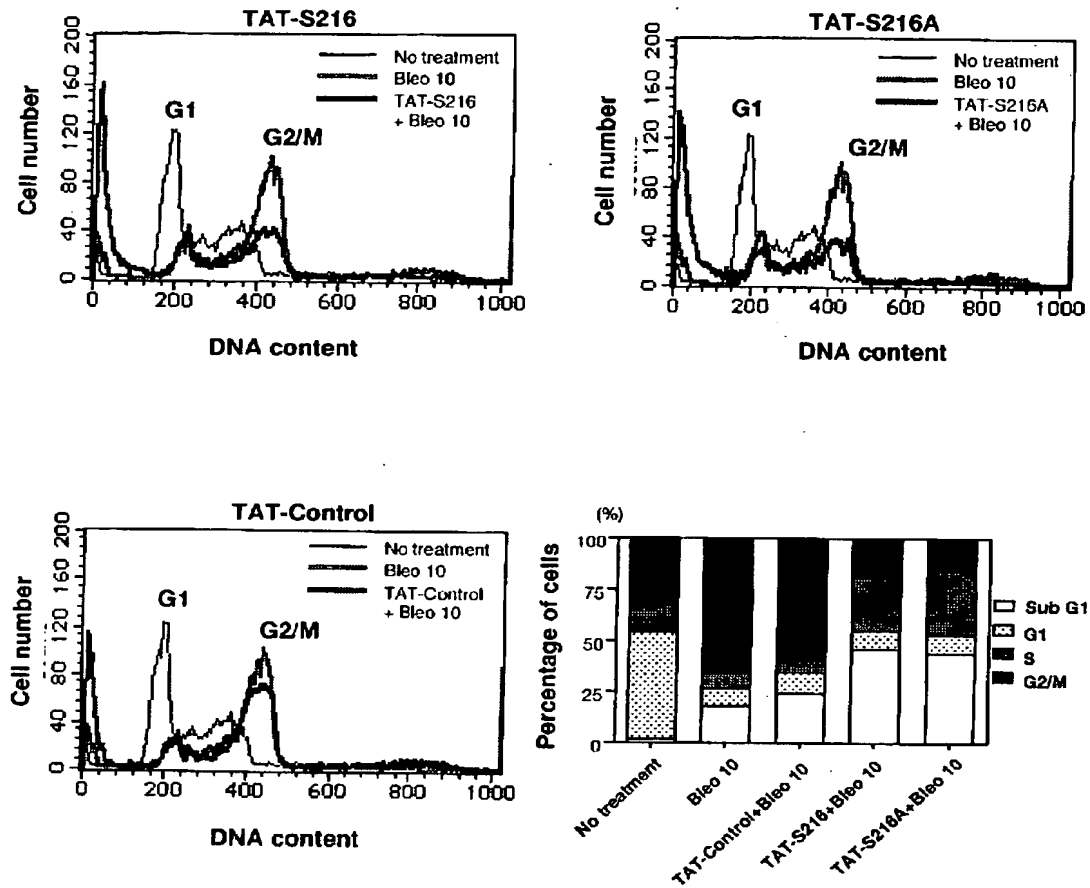
【図 1】



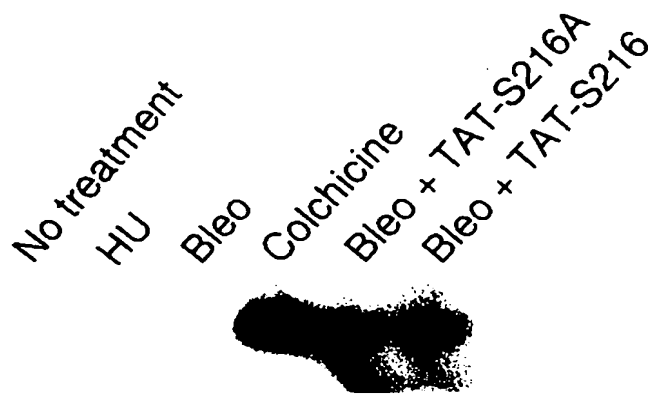
【図 2】



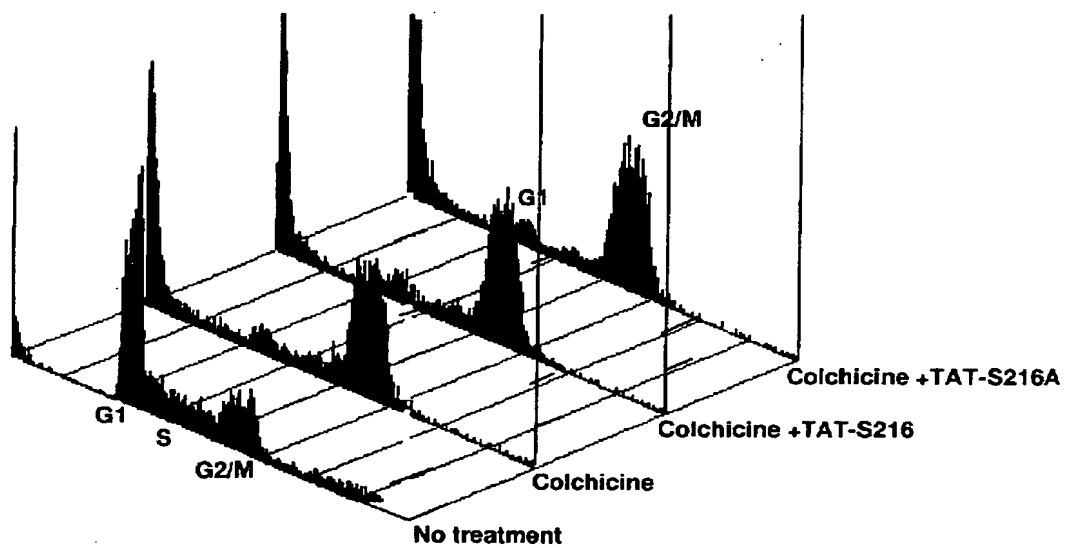
【図 3】



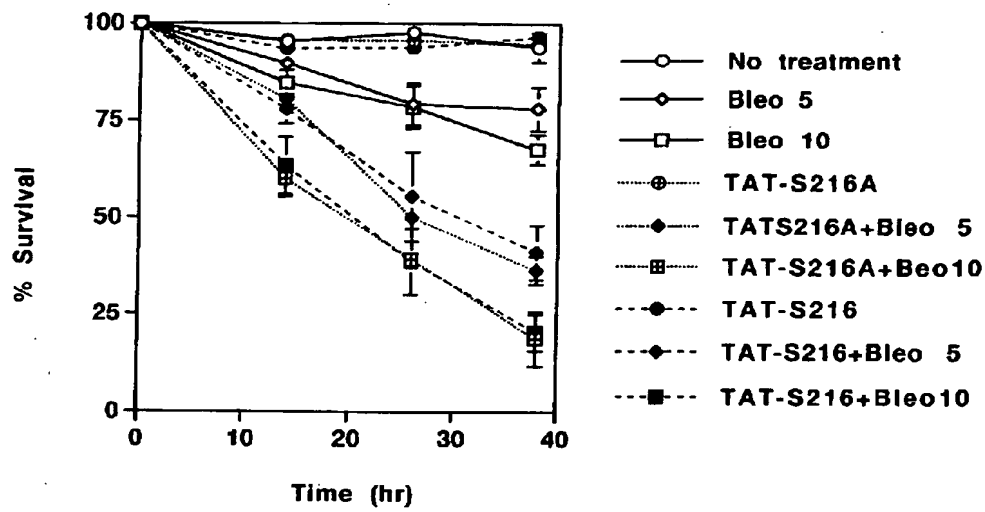
【図 4】



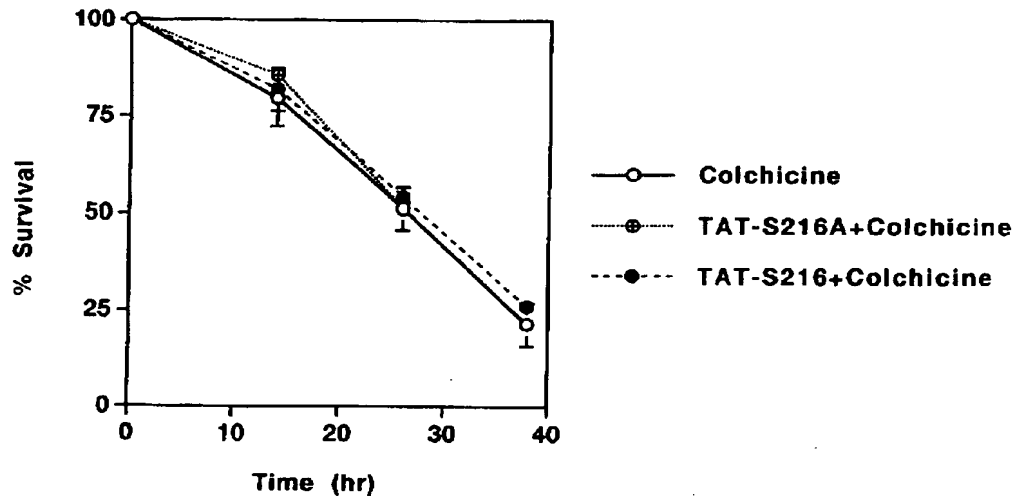
【図 5】



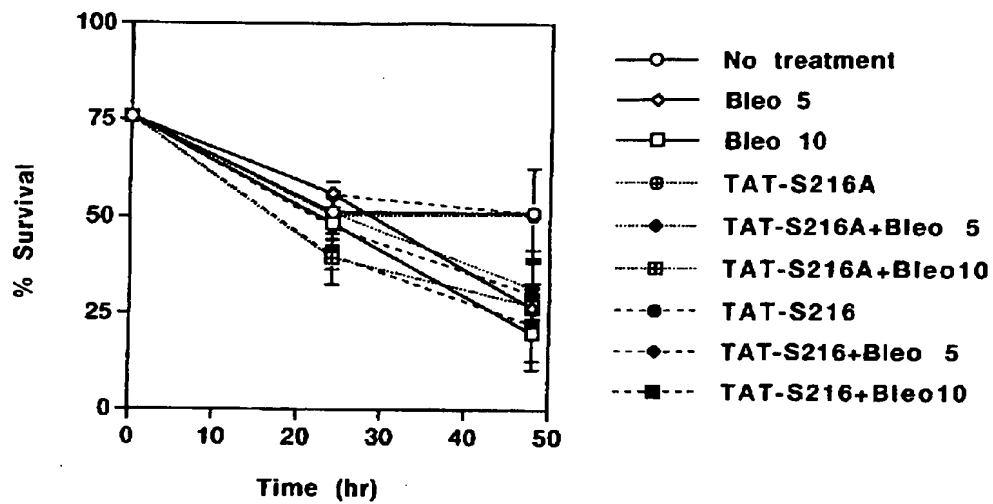
【図 6】



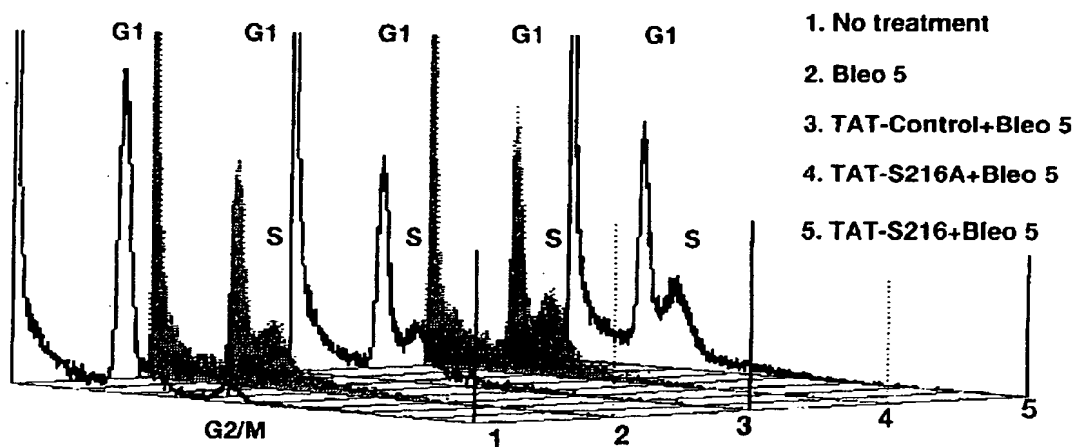
【図 7】



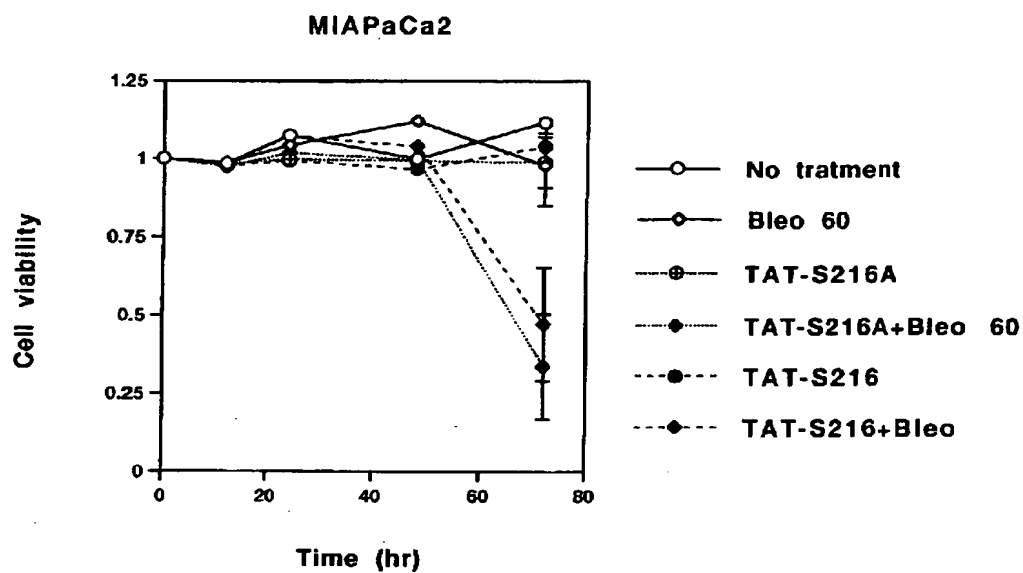
【図 8】



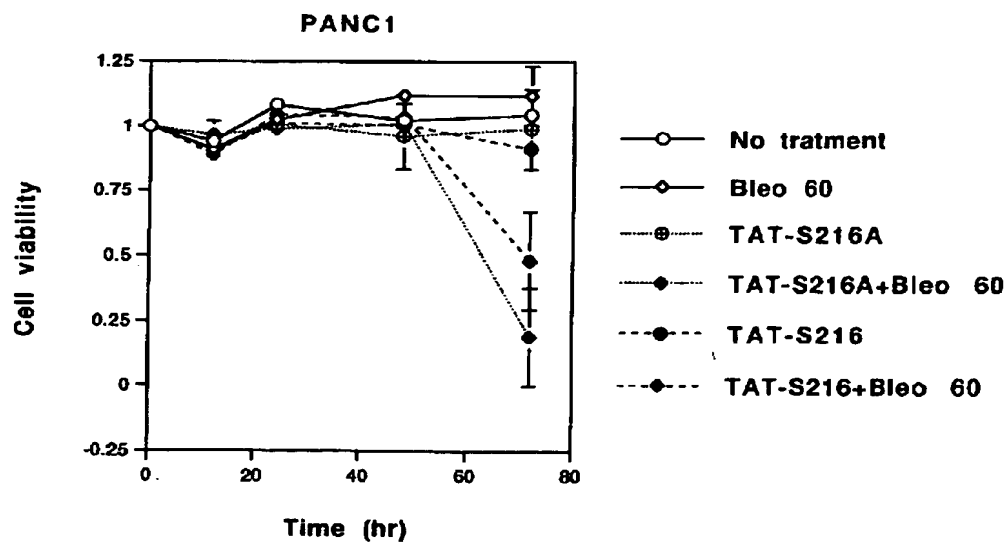
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 DNA 傷害処理による癌細胞の G 2 期停止を特異的に阻害することの
できるオリゴペプチドを提供する。

【解決手段】 配列番号 3 または 4 のアミノ酸配列からなるオリゴペプチド。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届

【提出日】 平成12年 9月19日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第269398号

【承継人】

【住所又は居所】 愛知県豊田市渋谷町 1 - 1 - 1 6

【氏名又は名称】 株式会社キャンバス

【承継人代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 4,200円

【提出物件の目録】

【物件名】 譲渡証書 2

【物件名】 委任状 1

(B)20001820068



譲渡証書

平成 12 年 8 月 28 日

住 所 愛知県名古屋市瑞穂区密柑山町 1-44-1 コーポ岡田 305号

譲受人 河 邊 拓 己



住 所 愛知県豊田市渋谷町 1-1-16

譲受人 菅 沼 正 司



住 所 愛知県名古屋市瑞穂区松栄町 2-76-2 メゾンファミール 2A

譲受人 岡 本 尚



住 所 愛知県豊明市二村台 7-35-5

譲受人 船 曳 孝 彦



住 所 埼玉県川口市本町四丁目 1 番 8 号

譲渡人 科学技術振興事業団

理事長 川 崎 雅 弘



下記の特許出願に係る特許を受ける権利の全部を貴殿に譲渡したことに相違ありません。

記

1. 特許出願の番号

特願平 11-269398 号

2. 発明の名称

オリゴペプチド

2

譲渡書

平成12年8月28日

譲受人

住所 愛知県豊田市渋谷町1-1-16
名称 株式会社キャンパス
代表者 菅 沼 正 司 殿

譲渡人

住所 愛知県名古屋市瑞穂区蜜柑山町1-44-1
コーポ岡田305号

氏名 河 邊 拓 己



住所 愛知県豊田市渋谷町1-1-16

氏名 菅 沼 正 司



住所 愛知県名古屋市瑞穂区松栄町2-76-2
メゾンファミリー2A

氏名 岡 本 尚



住所 愛知県豊明市二村台7-35-5

氏名 船 曳 孝 彦



下記の発明につきまして、私の特許を受ける権利の全てを貴殿に譲渡いたします。

(記)

特許出願番号

平成11年特許願第269398号

(B)20001820068



委 任 状

平成 12 年 8 月 28 日

私は、

識別番号 1 0 0 0 9 3 2 3 0 (弁理士) 西 澤 利 夫 氏

を以て代理人として下記事項を委任します。

1. 平成 1 1 年 特 許 願 第 2 6 9 3 9 8 号 に関する手続
1. 上記出願又は平成 年 願 第 号に基づく
特許法第 41 条第 1 項又は実用新案法第 8 条第 1 項の規定による優先権の主張
及びその取下げ
1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求
1. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に
基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続（権利維持の管理について
は除く）並びにこれらの権利の放棄
1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護標章）登録
に対する登録異議の申立てに関する手続
1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、
防護標章登録又は商標（防護標章）更新登録に対する無効審判の請求に関す
る手続
1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求
1. 上記出願に係る商標登録に対する取消しの審判の請求に関する手続
1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ
1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
1. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住 所 愛 知 県 豊 田 市 洪 谷 町 1 - 1 - 1 6

名 称 株 式 会 社 キ ャ ン バ ス

代 表 者 菅 沼 正 司



認定・付加情報

特許出願の番号	平成 1 1 年 特許願 第 2 6 9 3 9 8 号
受付番号	2 0 0 0 1 8 2 0 0 6 8
書類名	出願人名義変更届
担当官	東海 明美 7 0 6 9
作成日	平成 1 2 年 1 1 月 2 0 日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】	委任状（代理権を証明する書面）	1
	譲渡証書	1

次頁無

特願平 1 1 - 2 6 9 3 9 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 6 0 2 0 8 0 0]

1. 変更年月日	1 9 9 8 年 2 月 2 4 日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名	科学技術振興事業団

特願平 1 1 - 2 6 9 3 9 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 0 4 9 5 6 3 6]

1. 変更年月日	2 0 0 0 年 9 月 1 9 日
[変更理由]	新規登録
住 所	愛知県豊田市渋谷町 1 - 1 - 1 6
氏 名	株式会社キャンバス